Arnaldoa 21 (1): 241 - 250, 2014 ISSN: 1815-8242

Evaluación del daño de ADN de linfocitos humanos expuestos a cipermetrina y extracto etanólico de semillas de *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) "uva"

Evaluation of DNA damage in human lymphocytes exposed to cypermethrin and ethanolic extract of seeds *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) "grape"

Allen Mendoza Avalos, Carlos León Torres & Carlos Nomberto Rodríguez
Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo-Perú.
gerson_menav@hotmail.com; cartaviolabs@hotmail.com; untcarlos@hotmail.com;
Cecilia Betzabet Bardales Vásquez
Facultad de Ciencias. Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo-Perú
cbardalesv@upao.edu.pe

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el daño al ADN de linfocitos humanos inducidos por cipermetrina y el efecto protector del extracto etanólico de semilla de *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) "uva" se utilizó la electroforesis alcalina de una sola célula (ensayo cometa). Los linfocitos fueron aislados de muestras de sangre obtenidas de 6 donantes sanos, no fumadores con un rango de edad de 20 y 26 años y se cultivaron en Karyotyping Medium GIBCO™ PB-MAX™ por 24 horas. Los linfocitos fueron sometidos a un pre-tratamiento con soluciones de extracto etanólico de semilla de *Vitis vinífera* L. "uva" a concentraciones de 15 y 40 ppm durante 1 hora y transcurrido este tiempo fueron tratados con cipermetrina a una concentración de 20 ppm. Para el ensayo cometa se usó el método establecido por Olive *et al.,* 1992 modificado por Castillo, 2012. Los resultados permitieron apreciar que los linfocitos expuestos al extracto etanólico de semilla de *Vitis vinífera* L. (Vitaceae) "uva" y Cipermetrina muestran una disminución frente al daño en el ADN inducido por Cipermetrina.

Palabras clave: *Vitis vinifera*, Cipermetrina, Ensayo Cometa, Daño del ADN.

Abstract

The present study objective of evaluating the DNA damage in human lymphocytes induced by cypermethrin and the protective effect of the ethanolic extract of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) "grape" seeds. This study used the alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay). Lymphocytes were isolated from blood samples obtained from 6 healthy, non-smokersdonors, within an age range of 20-26 years, and afterwards cultured in GIBCO ™ PB-MAX™ Karyotyping Medium which was incubated at 37 ° C for 24 hours. Lymphocytes were pre-treatedwith an ethanolic extract of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) "grape" seed solution at concentrations of 15 and 40 ppm for 1 hour and after this time they were treated with Cypermethrin at a concentration of 20 ppm, hydrogen peroxide 50 mM was considered as positive control and Phosphate Buffer (PBS) as a negative control. The comet assay was done following the method established by Olive *et al.,* 1992. The results showed that lymphocytes exposed to the ethanolic extract of Vitis vinifera L. (Vitaceae) "grape" seeds and cypermethrin presented a DNA damage diminution induced by Cypermethrin; thus it's concluded that pretreatment of lymphocytes with ethanolic extract of *V. vinifera* L. (Vitaceae) seeds significantly reduces DNA damage caused by cypermethrin.

Key words: *Vitis vinifera*, Cypermethrin, comet assay, DNA Damage.

Introducción

Vitis vinifera L. (Vitaceae) "uva", es una de las especies económicamente más importantes debido a sus diversos usos en producción de vinos, jugo de uva industrial y otros productos alimenticios (Georgiev *et al.*, 2014). Esta especie se caracteriza por poseer un alto contenido de compuestos polifenólicos, los cuales se encuentran en las cáscaras y semillas. El extracto que puede obtenerse de sus semillas es principalmente rico en proantocianidinas, siendo los responsables del color rojo o rosado en las bayas de "uva", estos compuestos pertenecen a la familia de los flavonoides, son oligómeros y polímeros de las unidades del polihidroxi flavanol-3, tales como la (+)-catequina y la (-)-epicatequina (Bogdan & Baumann, 2009), asimismo, poseen propiedades farmacológicas, quimiopreventivas, actividad antioxidativa de importancia en la prevención de enfermedades cardiovasculares y el tratamiento de trastornos de piel (Clifton, 2004;Wetwitayaklung, 2008).

Existen numerosos estudios que

demuestran una gran actividad antioxidante y de reducción de radicales libres de las proantocianidinas. Se ha demostrado que los extractos de semillas de "uva" son más eficaces para eliminar radicales libres que las vitaminas C y E, vitamina E más C y β-caroteno contra la peroxidación lipídica y la fragmentación del ADN en ratones (Senthilmohana *et al*., 2003; Attia *et al*.,2008; Zhou *et al*., 2012); estos efectos han sido también confirmados por muchos estudios con animales, en la que proantocianidina inhibe la tumorogénesis en los tejidos como la piel (Gali *et al*., 2008), colon (Dinicola *et al*., 2012), de mama (Eng *et al*., 2003) y de la próstata (Raina *et al*., 2007). Por lo tanto, las proantocianidinas han sido de gran interés en estudios para la dosificación de personas expuestas a genotóxicos y como un modulador potencial de muchas dianas moleculares en enfermedades crónicas como el cáncer.

Actualmente, hay una presión cada vez mayor en la industria agrícola en todo el mundo, para producir mejores cosechas de calidad de una manera rentable. Como resultado, los pesticidas se han convertido en el componente más utilizado en el programa integrado de control de plagas. Una de los compuestos más usados para el control de plagas son los piretroides de origen sintético; dentro los cuales la cipermetrina es uno de los más utilizados como productos para el cultivo de la "vid" y como producto doméstico (Kotonia, 2004).

Algunos estudios recientes, indicaron que el uso de cipermetrina sobre el cultivo de la "vid" en niveles de residuos de manera responsable, son superiores a los límites máximos de residuos (LMR) y, podría plantear problemas de salud debido al consumo regular de esta fruta por parte de la población (Esmaeil, 2010). Se ha demostrado, que la Cipermetrina induce a la genotoxicidad sistémica en mamíferos, ya que causa daños en el ADN en órganos vitales mediados por radicales libres (Giri *et al*., 2003; Patel *et al*., 2006; Kocaman & Topaktas, 2009). Las rupturas en la cadena del ADN a nivel de células individuales mediadas por radicales libres pueden ser medidas por el ensayo cometa (Arencibia & Rosario, 2009).

En base al conocimiento actual, de la cantidad de enfermedades crónicas-degenerativas que se han asociado al excesivo uso de la cipermetrina, surge la necesidad de compuestos antioxidantes que sirvan para los tratamientos preventivos de este tipo de enfermedades, por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el daño de ADN de linfocitos humanos expuestos a cipermetrina y extracto etanólico de semillas de *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) "uva" mediante el ensayo cometa.

Material y métodos

Muestra: Los linfocitos fueron obtenidos de muestras sanguíneas de donantes varones sanos (de edad comprendida entre 20 y 26 años) mediante centrifugación (10 000 rpm por 10 min) e incubados a 37 °C durante 24 horas en GIBCO™ PB-MAX™ Karyotyping Medium. Para la elaboración del extracto se utilizó semillas de *V. vinifera* L. var. *italiana* obtenidas del Distrito de Cascas, La Libertad, Perú.

Métodos

Para la preparación del extracto de semilla de *V. vinifera* las semillas fueron secadas, molidas y pesadas (100 g), luego, se dejaron en reposo en etanol por 7 días. Transcurrido este tiempo de maceración, se separa la disolución etanólica del residuo sólido mediante filtración con papel filtro. El extracto etanólico así obtenido, se concentra por evaporación del disolvente hasta

reducir el volumen obtenido a la mitad.

Transcurrido las 24 horas de incubación de los linfocitos, se establecieron en seis grupos experimentales, a los cuales se le agregó el extracto de semilla de "uva" con diferentes concentraciones 15, 40 µg/ ml al medio de cultivo y se dejó incubar a 37 °C durante 1 hora.

Después del pretratamiento con extracto etanólico de la semilla de *V. vinifera* los linfocitos se incubaron durante 1 hora con cipermetrina a una concentración de 20 ppm y el control positivo (50 µM de H_2O_2) fue incubado durante 30 minutos y el control negativo fue tratado con PBS. Transcurrido este tiempo, los linfocitos fueron sometidos al ensayo cometa transcurrido las 24 horas de la aplicación de la cipermetrina. El ensayo cometa alcalino, se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito Olive *et al.*, 1992 modificado por Castillo (2012), para tal fin, se realizaron preparaciones colocando 140 µl de agarosa de punto de fusión normal (SIGMA) sobre un portaobjetos esmerilado y se dejó solidificar a temperatura ambiente; después se agregó una segunda capa de 210 µl (140 µl de agarosa de bajo punto de fusión [LMP, SIGMA] más 70 µl de células sanguíneas), inmediatamente, se colocó un cubreobjetos para obtener una distribución apropiada de células a lo largo de la primera capa de gel, entonces las muestras se colocaron a 4 °C por 10 min para que solidificara. Finalmente, se retiraron los cubreobjetos y se sumergieron los portaobjetos en una solución de lisis compuesta de detergentes y sales concentradas (2,5 M NaCl, 100 mM Na2EDTA, 10 mM tris-HCl, 1% Tritón X-100; pH 10) durante toda la noche a 4 ºC. Con esta solución, se lisaron las paredes celulares y nucleares y el ADN que se encontraba superenrrollado se liberó dando lugar a los nucleoides. Los siguientes pasos se realizaron en oscuridad para prevenir el daño adicional al ADN que puede producir la luz. Se prosiguió a colocar los portaobjetos en un buffer de electroforesis alcalino (300 mM NaOH y 1 mM Na2EDTA; pH > 13), durante 20 minutos, provocando el desenrrollamiento de la doble hebra. Luego de la electroforesis (25 V, 300 mA, 20 min, 4 ºC), los portaobjetos se lavaron suavemente 2 veces, a intervalos de 5 minutos cada uno con PBS 10 X. Para la visualización de los linfocitos se tiñeron con 75 µl de Naranja de acridina y revisados con un microscopio de fluorescencia a una amplificación de 10X.

Toma de datos y procesamiento estadístico: En cada muestra se evaluaron 100 linfocitos, para ello se realizaron la captura de imágenes de los linfocitos mediante el software DP2-BSW y se obtuvieron los parámetros del test del cometa: Olive Tail Moment, Tail moment y % Tail DNA correspondientes a los linfocitos humanos expuestos a cipermetrina y extracto de semilla de *Vitis vinifera*, mediante el software CometScore 1.5 (software libre).

Los datos obtenidos correspondientes a Olive Tail Moment, Tail moment y % Tail DNA fueron procesados estadísticamente mediante el análisis de varianza.

Resultados

En la Fig. 1. A se observó que las células expuestas Buffer fosfato (PBS) no presentaron ninguna migración del ADN, mantuvieron su forma esférica, mientras que en la Fig. 1. B y C se evidencia mayor migración del ADN (cola del cometa) en las células individuales expuestas a Peróxido de Hidrogeno 50 µM y Cipermetrina 20 ppm comparado con las células tratadas con extracto de semilla de *V. vinifera* (ESU) (Fig.1. D y E) en el cual las células

manifestaron una pequeña expansión que se traduce como daño al ADN; mientras que las células expuestas a diferentes concentraciones 15 y 40 ppm del ESU más cipermetrina manifestaron una disminución del daño al ADN (Fig.1. F y G).

El tratamiento con cipermetrina 20 ppm los valores de % Tail DNA fueron cercanos a los valores del control con Peróxido de Hidrogeno 50 µM y en los tratamientos con ESU y cipermetrina se registra valores promedios disminuidos signifativos con respecto al control positivo y tratamiento con cipermetrina 20 ppm (Tabla 1, Fig. 2).

Tabla 1. Cuantificación de daño en el ADN en cometas de linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de extracto de semilla de *V. vinifera* y cipermetrina.

Tratamientos	% Tail DNA	Tail Moment	Olive Tail Moment
Control negativo	3.81 ± 0.57	0.87 ± 0.33	0.742 ± 0.45
Control positivo (50 µM H2O2)	18.04 ± 0.57	15.1 ± 0.33	12.34 ± 0.45
Cipermetrina 20 ppm	14.22 ± 0.57	4.41 ± 0.33	4.08 ± 0.45
ESU			
15 ppm	6.33 ± 0.57	3.71 ± 0.33	2.04 ± 0.45
40 ppm	6.25 ± 0.57	3.45 ± 0.33	1.65 ± 0.45
ESU/ Cipermetrina			
15/20 ppm	8.83 ± 0.57	4.64 ± 0.33	2.46 ± 0.45
40/20 ppm	7.44 ± 0.57	4.18 ± 0.33	2.18 ± 0.45

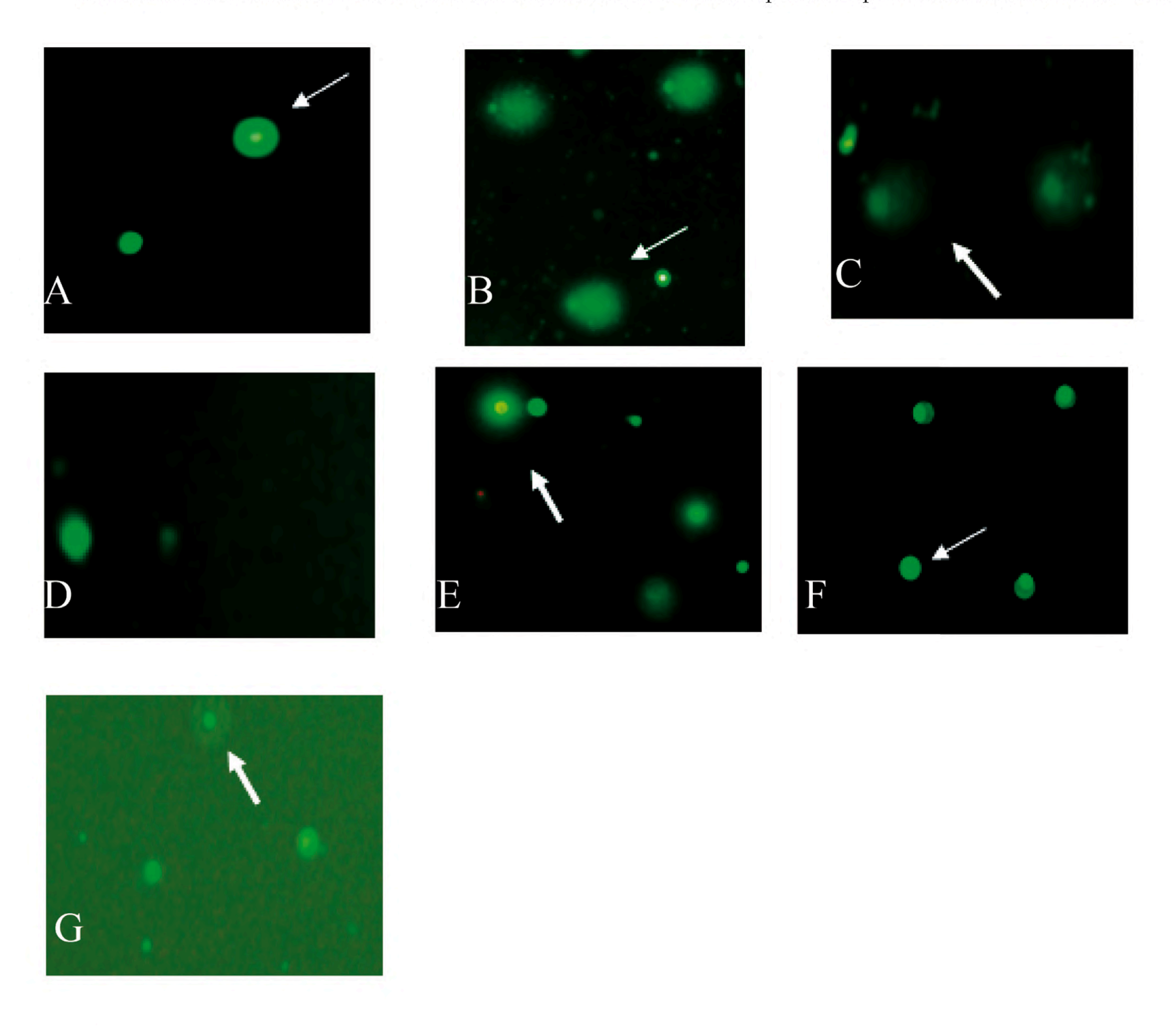
ESU (Extracto de semilla de *V. vinifera*)

($p<0.05$) * Diferencia significativa

Discusión

En este estudio, mediante el ensayo cometa se demuestra claramente que la cipermetrina induce roturas de hebras en el ADN de linfocitos humanos; donde los valores promedios para el % Tail DNA, Tail Moment y Olive Moment Tail en linfocitos humanos expuestos a Cipermetrina a una concentración de 20 ppm. Estos resultados concuerdan con los reportados por Patel *et al.* (2006), donde la cipermetrina a una concentración de 25 ppm induce a roturas de hebras en ADN de linfocitos de ratones evaluadas mediante el ensayo cometa.

Estos daños, pueden deberse a la naturaleza hidrófoba y pequeño tamaño molecular de la cipermetrina, lo cual le permite, pasar a través de la membrana celular y llegar al núcleo. Se sugiere que dentro del núcleo la cipermetrina se une al ADN a través de los grupos reactivos de su resto ácido, que conduce a la desestabilización, así como el desenrollado del DNA, que podría ser un mecanismo posible para su genotoxicidad. Se ha demostrado en sistemas experimentales que



A) T_1: Control negativo;

B) T_2: Control positivo (50 µM DE H2O2);

C) T_3: Concentración de cipermetrina 20 µg/ml;

D) $T_{4:}$ Concentración de extracto de semilla de *V. vinifera* 15 µg/ml;

E) T_5: Concentración de extracto de semilla de *V. vinifera* 40 µg/ml;

F) T_6: Concentración de extracto de semilla de *V. vinifera* 15 µg/ml y Concentración de cipermetrina 20 µg/ml;

G) T_7: Concentración de extracto de semilla de *V. vinifera* 40 µg/ml y Concentración de cipermetrina 20 µg/ml.

Fig. 1. Efecto protector del extracto de semilla de "uva" en el ADN, mediante el ensayo cometa (A-G). Cambios en los niveles de daño en el ADN: (A) normal, (B) linfocitos inducidos por 50 µM H2O2, (C) linfocitos inducidos por Cipermetrina 20 ppm, (D-F) linfocitos expuestos a extracto de semilla de *V. vinifera* 15 y 40 ppm, (E-G) linfocitos inducidos por Cipermetrina 20 ppm + extracto de semilla de *V. vinifera* 15 y 40 ppm.

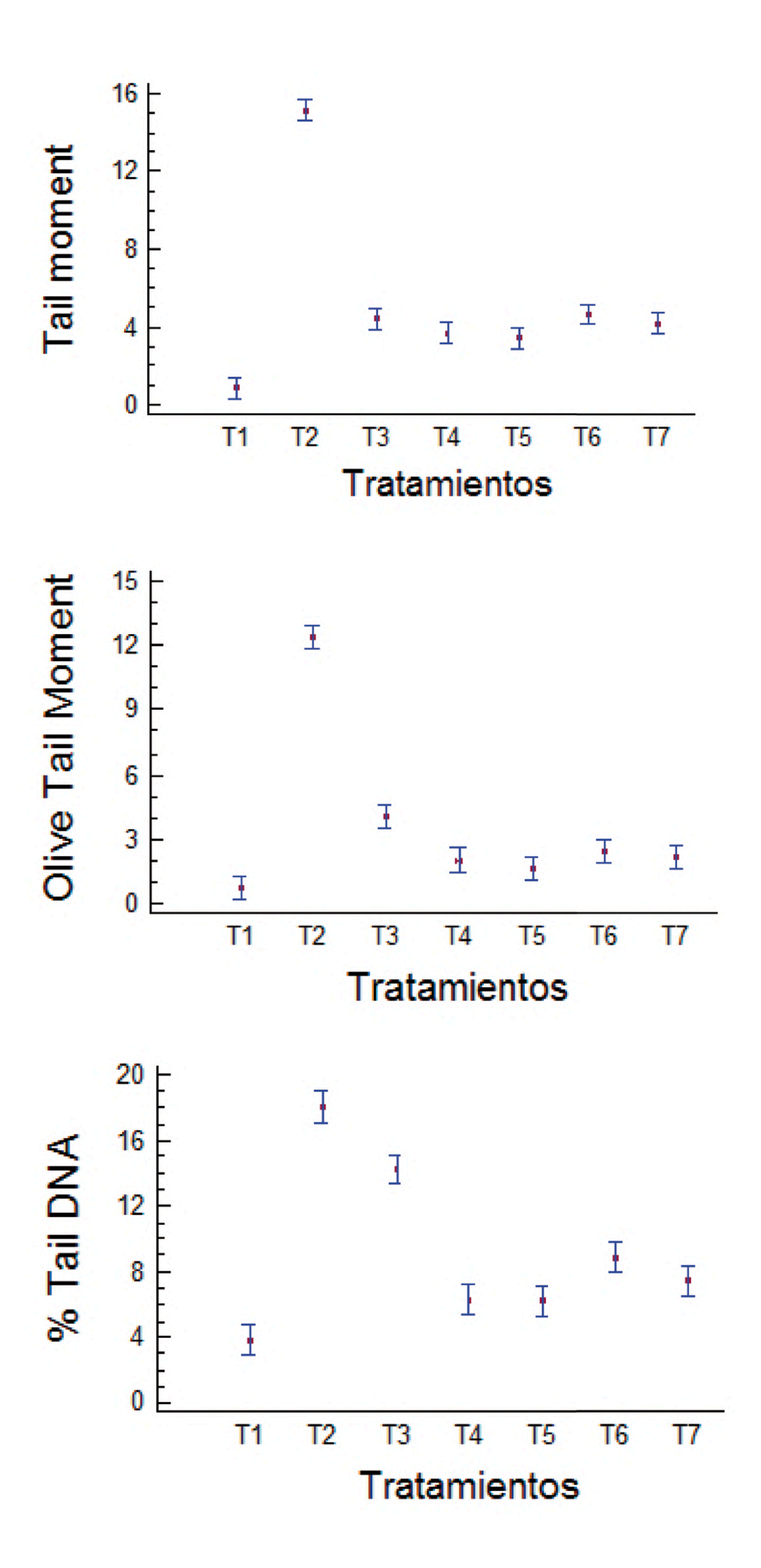


Fig. 2. Nivel de daño de ADN de linfocitos humanos (A). Tail moment, (B). Olive tailmoment y (C). % Tail DNA inducidos por Peróxido de Hidrógeno, Cipermetrina y extracto de semilla de *V. vinifera.*

la cipermetrina induce el estrés oxidativo y la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) las cuales pueden causar daño en el ADN, lo que podría conducir a roturas de cadena simple y la mutación (Kale *et al.*, 1999; Giray *et al.*, 2001; Zegura *et al.*, 2004; Saxena *et al.*, 2005).

Otro estudio, realizado por Attia *et al.*, 2010 determinó mediante el ensayo cometa que el pre-tratamiento con proantocianidinas de semilla de *V. vinifera* disminuye el daño en el ADN de médula ósea de ratones ocasionado por Doxorubicina a una concentración de 12 mg/kg, cuyos resultados mostraron una reducción altamente significativa en los parámetros Tail Moment, % Tail DNA, Tail Length y Olive Moment del ensayo cometa. Demostrando de esta manera que las proantocianidinas de semilla de "uva" interceptaron los radicales de superóxido, hidroxilo, radicales peroxilo, peroxinitrito y quelaron los metales redox-activos, protegiendo de esta manera a las membranas celulares contra el ataque oxidativo generado por la Doxorubicina.

A pesar de su eficacia para la interceptación de los radicales libres, especies reactivas de oxígeno, el extracto de semilla de *V. vinifera* muestra poco daño al ADN en comparación al daño ocasionado por el Peróxido de Hidrógeno 50 µM y Cipermetrina 20 ppm. Este daño al ADN se puede deber a algunos de los compuesto citotóxicos del extracto de semilla de "uva". Xia *et al.,* 2010 reportó sobre la toxicidad potencial de algunos polifenoles de "uva" como epicatequina a los fibroblastos y líneas celulares de queratinocitos, y catequina en células de bazo de ratones. Donde después de exponer las dos líneas celulares de epicatequina durante 24 horas llegó a demostrar que los efectos negativos se observaron cuando la concentración era 3-7 veces mayor que la de la actividad antioxidante.

Esto proporciona una evidencia, de que el daño en el ADN observado después de la exposición a la cipermetrina, podría ser una consecuencia del ataque de los radicales libres sobre el ADN. De esta manera, la inducción a daños en el ADN de linfocitos humanos expuestos a cipermetrina puede conducir a un aumento en la susceptibilidad hacia enfermedades y trastornos en los seres humanos. Por lo tanto, la importancia de este estudio radicó en la capacidad de interceptación de radicales libres y de especies reactivas de oxígeno (ERO) del extracto de semilla de "uva", que pueden ser ocasionados por la exposición a cipermetrina, obteniéndose una reducción del daño al ADN de linfocitos humanos expuestos a la cipermetrina.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio, indican que la exposición de los linfocitos humanos a la cipermetrina a 20 ppm ocasiona daño en el ADN de manera significativa ($p<0.05$).

El extracto etanólico de semilla de *Vitis vinifera* a las concentraciones de 15 ppm y 40 ppm produce una reducción del daño del ADN de linfocitos humanos ocasionado por Cipermetrina, demostrado a través de los parámetros de %DNA in Tail, Tail Moment y Olive Moment Tail.

Literatura citada

Ar**encibia, D. & L. Rosario**. 2009. Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos *in vitro*. Retel 20 (3): 24-41.

At**tia, S.; G. Helal; M. Abd-Ellah & A. Mansour.** 2008. The effects of oral grape seed extract on cisplatin-induced cytogenotoxicity in mice. Saudi Pharm. J. 16 (2): 161-169.

Attia, S.; S. Bakheet & N. Al-Rasheed. 2010.

Proanthocyanidins produce significant attenuation of doxorubicin-induced mutagenicity via suppression of oxidative stress. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 3 (6): 404-413.

Bogdan, I. & L. Baumann. 2009. Antioxidantes. Rev. Chilena Dermatol. 25 (1): 8-20.

Castillo, R. 2012. Cuantificación del daño de AND por el test del cometa en linfocitos humanos expuestos al extracto etanólico de *Leucaenatrichoides*. Tesis de Título, Trujillo, Universidad Nacional de Trujillo.

Clifton, P. 2004. Effect of Grape Seed Extract and Quercetin on Cardiovascular and Endothelial Parameters in High-Risk Subjects. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2004 (5) 272–278.

Dinicola, S.; A. Cucina; A. Pasqualato; F. D'Anselmi; S. Proietti & E. Elisabetta. 2012. Antiproliferative and Apoptotic Effects Triggered by Grape Seed Extract (GSE) versus Epigallocatechin and Procyanidins on Colon Cancer Cell Lines. Int J Mol Sci. 13 (1): 651-664.

Eng, E.; J. Ye; D. Williams; S. Phung; R. Moore; M. Young & U. Gruntmanis. 2003. Suppression of estrogen biosynthesis by procyanidin dimers in red wine and grape seeds. Cancer Res. 63 (23): 8516-22.

Esmaeil, S. & R. Somashekar. 2010. Synthetic pyrethroides multiresidue in grapes from southern india. kathmandu university journal of science, engineering and technology.6 (2): 104-110.

Gali, H.; E. Perchellet; X. Gao; P. Laks & J. Perchellet. 1993. Inhibitory effects of semisynthetic flavonoid derivatives on the biochemical markers of tumor promotion in mouse epidermis in vivo. Cancer Lett. 72 (3):149-56.

Georgiev, V.; A. Ananga & V. Tsolova. 2014. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. Nutrients. 6: 391-415.

Giray, B.; A. Gurbay & F. Hincal. 2001. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by Vitamin E or allopurinol. Toxicol. Lett. 118 (3): 139–146.

Giri, S.; A. Giri; G. Dutt & S. Bali. 2003. Induction of sister chromatid exchanges by cypermethrin and carbosulfan in bone marrow cells of mice in vivo. Mutagenesis. 18 (1): 53–58.

Kale, M.; N. Rathore; S. John & D. Bhatnagar. 1999. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues in pyrethroid toxicity: possible involvement of reactive oxygen species. J. Nutr. Environ. Med. 9 (1): 37–46.

Kocaman, A. & M. Topaktas. 2009.The *in vitro* genotoxic effects of a commercial formulation of α-cypermethrin in human peripheral blood lymphocytes. Environmental and Molecular Mutagenesis. 50: 27-36.

Kotonia, A.; K. Liapis & B. Ziogas. 2004. Determination of residues of 14 insecticides and metabolites in grapes and peaches by gas chromatography–mass spectrometry. European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment. 3: 273-75

Patel, S.; A. Pandey; M. Bajpayee; D. Parmar & A. Dhawan. 2006. Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: Evidence from the comet assay. Mutation Research/Genetic Toxicology. 607 (2): 176–183.

Raina, K.; R. Singh; R. Agarwal & C. Agarwal. 2007. Oral grape seed extract inhibits prostate tumor growth and progression in TRAMP mice. Cancer Res. 67 (12): 5976-82.

Saxena, P.; L. Chauhan & S. Gupta. 2005. Cytogenetic effects of formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum:* spectroscopic basis of chromosome damage. Toxicology. 216 (2-3): 244–252.

Senthilmohana, S.; J. Zhangb & R. Stanley. 2003. Effects of flavonoid extract Enzogenol with vitamin C on protein oxidation and DNA damage in older human subjects. Nutrition Research. 23 (2003) 1199–1210.

Wetwitayaklung, P.; T. Yamrote; N. Phunttumatamat; N. Kaewnuan & P. Makchumnum. 2008. A Determination of the Antioxidant Activity of Proanthocyanidin of Thai Cultivated Grape Seed, L-Ascorbic Acid, and Trolox by Means of FRAP Assay. Bulletin of the Department of Medical Sciences. 50 (1): 24-34.

Xia, E.; G. Fang; Y. Guo & H. Bin. 2010. Biological Activities of Polyphenols from Grapes.

Int. J. Mol. Sci. 11 (12): 622-646.

Zegura, B.; T. Lah & M. Filipic. 2004. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. Toxicology. 200 (1): 59–68.

Zhou, K & J. Raffou. 2012. Potential Anticancer Properties of Grape Antioxidants. Journal of Oncology. 2012.